

## تأثیر PMSG و hCG بر فولیکول‌های تخمدان موش سوری نژاد NMRI

خدیجه خالقی<sup>۱</sup>، فرزاد رجایی<sup>۲\*</sup>، امیر جوادی<sup>۳</sup>، ندا عابدپور<sup>۱</sup>

### چکیده

**زمینه و هدف:** در بیماران مبتلا به ناباروری جهت دستیابی به تخمک‌های متعدد در یک سیکل، از داروهای محرک تخمک‌گذاری استفاده می‌شود تا شانس بارداری افزایش یابد. این مطالعه با هدف تعیین اثر تحریک تخمدان بر رشد فولیکول‌های تخمدانی و جسم زرد در موش نژاد NMRI انجام شد.

**روش بررسی:** در این مطالعه، ۴۰ سرموش سوری ماده ۶ هفته‌ای از نژاد NMRI انتخاب و به ۴ گروه ۱۰ تایی تقسیم شد. به گروه کنترل نرمال سالی و به گروه دوم ۷ واحد، به گروه سوم ۱۰ واحد و به گروه چهارم ۱۲ واحد، PMSG تزریق شد. ۴۸ ساعت بعد hCG به همان میزان تزریق گردید. ۲۴ ساعت بعد از تزریق hCG، موش‌ها به روش جابجایی مهره‌های گردنی کشته و تخمدان‌های آنها خارج شد. در ادامه، پس از رنگ آمیزی و تهیه اسلایدهای میکروسکوپی، اندازه تخمدان، تعداد و اندازه جسم زرد و فولیکول‌های تخمدان با استفاده از آزمون‌های آماری اسمیرنوف، واریانس و کروسیکال والیس در سطح معنی‌داری کمتر از ۰/۰۵ تجزیه و تحلیل شدند.

**یافته‌ها:** در این بررسی، تحریک تخمک‌گذاری با هورمون‌های PMSG و hCG باعث تغییرات در اندازه و تعداد فولیکول‌های تخمدانی، تخمدان و جسم زرد شد.

**نتیجه‌گیری:** نتایج مطالعه حاضر نشان داد تحریک تخمک‌گذاری با هورمون PMSG و HCG می‌تواند باعث افزایش تعداد فولیکول‌های اولیه چندلایه و کاهش اندازه فولیکول‌های گراف و جسم زرد شود.

**کلید واژه‌ها:** تحریک تخمک‌گذاری؛ پی ام اس جی؛ اچ سی جی؛ تخمدان؛ جسم زرد؛ موش‌ها.

<sup>۱</sup>کارشناس ارشد علوم تشریحی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی قزوین، قزوین، ایران.

<sup>۲</sup>استاد بافت‌شناسی و جنین‌شناسی، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی قزوین، قزوین، ایران.

<sup>۳</sup>دکتری آمار، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی قزوین، قزوین، ایران.

\*نویسنده مسئول مکاتبات:

فرزاد رجایی، دانشگاه علوم پزشکی قزوین، قزوین، ایران؛

آدرس پست الکترونیکی:

farzadraj@yahoo.co.uk

تاریخ دریافت: ۹۲/۴/۲

تاریخ پذیرش: ۹۲/۶/۱۹

لطفاً به این مقاله به صورت زیر استناد نمایید:

KhaleghiKh, Rajaei F, Javadi A, Abedpour N. The effect of PMSG and hCG on the ovarian follicles in NMRI strain mice. Qom Univ Med Sci J 2014;8(3):1-10. [Full Text in Persian]

## مقدمه

با توجه به گسترش علم پزشکی، هنوز هم ناباروری به عنوان یک معضل مهم مطرح است و حدود ۱۵-۱۰٪ از زوجها دچار این مشکل هستند. امروزه، در اکثر نقاط دنیا مراکز ناباروری دایر شده است. این پدیده نشان می‌دهد علی‌رغم گسترش روزافزون دانش پزشکی، همچنان حل معضل ناباروری از موارد ضروری است (۱). تخمک‌گذاری بیماران جهت دستیابی به تخمک‌های متعدد در یک سیکل، با استفاده از داروهای محرک، تحریک می‌شود تا بدین وسیله شانس بارداری افزایش یابد (۲). با این حال، نقش مهم تحریک تخمدان در تکنیک‌های کمک باروری، اثرات زیانبار آن بر روی تشکیل تخمک، کیفیت جنین و پذیرش آندومتر همچنان در حال بررسی است (۲). فولیکول تخمدانی، واحد اصلی ساختاری و عملکردی تخمدان پستانداران است که محیط لازم برای رشد و بلوغ تخمک را فراهم می‌کند (۳). با وجود جمعیت بزرگ فولیکول‌های بدوی حاضر در تخمدان، در طول فولیکولوژنز، بسیاری از فولیکول‌ها دستخوش آترزی می‌شوند و تنها تعداد کمی به مرحله پیش تخمک‌گذاری می‌رسند (۴). فولیکول‌های تخمدان که حاوی یک اووسیت متوقف‌شده در مرحله دیپلوئن اولین تقسیم میوز هستند؛ رشد و نمو خود را در پاسخ به یک‌سری از علائم آغاز می‌کنند (۵). در مطالعات تولیدمثل و ناباروری، تحریک تخمدانی و افزایش تعداد تخمک‌های قابل‌دسترس توسط گنادوتروپین‌ها از اهمیت زیادی برخوردار است. فولیکول‌ها براساس مشخصات مورفولوژیکی طبقه‌بندی شده‌اند. شایان ذکر است این سیستم طبقه‌بندی براساس گونه و روش انتخابی نویسنده می‌تواند دارای تنوع زیادی باشد (۶،۷).

فولیکول بدوی (Primordial Follicle) حاوی یک اووسیت اولیه است که با یک لایه سلول‌های فولیکولی مسطح احاطه شده است. در فولیکول اولیه تک‌لایه (Unilayer Primary Follicle)، اووسیت توسط یک لایه سلول‌های فولیکولی مکعبی ساده و در فولیکول اولیه چندلایه (Multilayer Follicle) یا پری‌آنترال (Preantral)، اووسیت به وسیله چندلایه سلول‌های مکعبی یا همان سلول‌های گرانولوزا احاطه شده است.

در فولیکول ثانویه (Secondary) یا آنترال، تزاید سلول‌های گرانولوزا افزایش یافته و حفره‌های آنترومی حاوی مایع در بین آنها ایجاد می‌شود. در فولیکول بالغ یا گراف یا پیش تخمک‌گذاری (Graafian follicle)، حفره آنترومی بزرگ شده و فولیکول به بزرگترین اندازه خود می‌رسد و آماده تخمک‌گذاری می‌شود (۸،۹). امروزه، تحریک تخمدان در بالین به وسیله انواع مواد فارماکولوژیک انجام می‌شود. از گنادوتروپین به‌طور معمول برای تحریک تخمدان، افزایش و القای تخمک‌گذاری در برنامه‌های لقاح آزمایشگاهی در انسان و حیوانات استفاده می‌گردد (۱۰).

PMSG (Pregnant Mare Serum Gonadotropin) هورمون مشابه FSH (Follicle Stimulating Hormone) است و به دلیل کارایی بالا و تزریق تک‌دوزی، استفاده گسترده‌ای در تحقیقات جنین‌شناسی دارد و به‌صورت زیرجلدی یا داخل صفاقی تزریق می‌گردد (۱۱). از طرفی، دریافت تک‌دوزی هورمون‌های گنادوتروپین منجر به افزایش تعداد و کیفیت اووسیت‌ها می‌شود (۱۲). همچنین به دلیل دسترسی تجاری به هورمون hCG (human Chorionic Gonadotropin)، این هورمون جایگزین LH (Luteinizing Hormone) خالص شده که باعث تخمک‌گذاری می‌شود و چون باید قبل از ترشح LH حیوان وارد گردش خون گردد، تنها به طریق داخل صفاقی تزریق می‌شود (۱۳). مشخص شده است متابولیسم گلوکز در سلول‌های کومولوس فولیکولی تحت تأثیر گنادوتروپین‌ها افزایش یافته که منجر به رشد فولیکول‌های پری‌آنترال و آنترال می‌گردد (۱۴). hCG نفوذپذیری رگ‌های تخمدان را افزایش داده و موجب انتقال مواد ضروری برای گسترش کومولوس و رشد فولیکول می‌شود (۱۵). همچنین اثبات شده است hCG می‌تواند باعث افزایش اکسیداسیون گلوکز در طی بلوغ آزمایشگاهی تخمک گاو و افزایش ظرفیت‌های رشد و نمو گردد (۱۶). با توجه به اهمیت بررسی اثرات تحریک تخمک‌گذاری بر تخمدان و تفاوت این مطالعه با تحقیقات انجام‌شده قبلی از نظر پروتکل تحریک تخمک‌گذاری مبنی بر استفاده از سه دوز متفاوت دارو، این پژوهش با هدف تغییرات مورفومتریک تخمدان پس از تحریک تخمک‌گذاری انجام شد.

## روش بررسی

در این مطالعه، ۴۰ سر موش سوری ماده ۶ هفته‌ای نژاد NMRI از مؤسسه واکسن و سرم‌سازی رازی تهیه و در شرایط ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی در دمای ۲۵-۲۰°C نگهداری شدند و محدودیتی از نظر دسترسی به آب و غذا نداشتند. موش‌ها به‌صورت تصادفی به ۴ گروه ۱۰ تایی تقسیم شدند. به‌گروه کنترل نرمال سالیین و به‌گروه دوم ۷ واحد، به‌گروه سوم ۱۰ واحد و به‌گروه چهارم ۱۲ واحد PMSG به‌صورت داخل صفاقی تزریق گردید. ۴۸ ساعت بعد از تزریق PMSG، hCG به‌همان میزان و به‌صورت داخل صفاقی تزریق شد. ۲۴ ساعت بعد از تزریق hCG، موش‌ها به‌روش جابجایی مهره‌های گردنی کشته شدند و تخمدان سمت راست از هر موش خارج گردید. پس از نمونه‌برداری، بافت‌های مورد نظر جهت فیکساسیون در پارافرماید ۱۰٪ با pH=۷/۲ به مدت ۷۲ ساعت قرار داده شدند. سپس مراحل آگیری تدریجی با اتانول (۱۰۰-۵۰٪) و شفاف‌سازی با زایلین و قالب‌گیری در پارافین انجام گرفت. در ادامه، با تهیه برش‌های سریالی ۵ میکرونی، با همتاکسیلین و ائوزین رنگ‌آمیزی شدند. پس از رنگ‌آمیزی H&E، لام‌های میکروسکوپی تهیه و با دوربین Canon Ixus 970is 10mpixel از برش‌های انتخاب‌شده، تحت میکروسکوپ نوری عکس‌برداری شد. از مقطع تخمدان تحت بزرگنمایی ۳/۲، اجسام زرد تحت بزرگنمایی ۱۰ و فولیکول‌ها تحت بزرگنمایی ۴۰، عکس گرفته شد و عکس‌ها به کامپیوتر منتقل و با برنامه نرم‌افزاری Image Tool، حداقل و حداکثر طول

(قطر) تخمدان، فولیکول‌ها و جسم زرد اندازه‌گیری شد. لازم به ذکر است جهت اندازه‌گیری قطر فولیکول، از سلول‌های تکا و اینترستیشیال اطراف غشای پایه صرف‌نظر شد (۱۷). برای بررسی تعداد از هر مقطع و از وسطی‌ترین برش، انواع فولیکول‌ها و جسم زرد به‌صورت مارپیچ در جهت عقربه ساعت به سمت مدولا شمارش شدند و این شمارش به تفکیک انواع فولیکول انجام گرفت (۱۸). نمونه‌ها از نظر اندازه تخمدان، تعداد، اندازه جسم زرد و فولیکول‌های تخمدان در گروه‌های چهارگانه مورد مقایسه قرار گرفتند. تجزیه و تحلیل با استفاده از آزمون‌های کلموگراف اسمیرنوف، واریانس، کروسیکال والیس و آزمون توکی و Dunn's صورت گرفت. سطح معنی‌داری، کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

## یافته‌ها

در این مطالعه در بین گروه‌ها تعداد فولیکول‌های اولیه تک‌لایه و تعداد فولیکول‌های ثانویه یا آنترال، اختلاف معنی‌داری نداشتند. تعداد فولیکول‌های اولیه چندلایه یا پری‌آنترال در گروه ۴ نسبت به گروه ۱، ۲ و ۳ نسبت به گروه کنترل، افزایش معنی‌داری داشت (p<۰/۰۱). تعداد فولیکول‌های گراف یا بالغ فقط در گروه ۴ نسبت به سایر گروه‌ها افزایش معنی‌داری نشان داد. تعداد جسم زرد نیز در گروه ۴ و ۳ نسبت به گروه ۲ و کنترل، افزایش معنی‌داری داشت (جدول شماره ۱).

جدول شماره ۱: مقایسه شاخص‌های عددی تعداد متغیرهای مورد بررسی به تفکیک گروه‌های مورد مطالعه

تعداد متغیر	گروه ۱	گروه ۲	گروه ۳	گروه ۴	pvalue
فولیکول اولیه تک‌لایه*	۲±۳	۳±۳	۲±۳	۲±۳	۰/۳
فولیکول اولیه چندلایه*	۳±۳	۴±۲	۴±۴	۶±۶	۰/۰۰۲
فولیکول ثانویه*	۲±۲	۲±۳	۳±۳	۳±۳	۰/۸
فولیکول گراف†	۱/۲۹±۱/۱۸	۱/۱۳±۱/۰۸	۱/۴۵±۱/۲۸	۲/۷۱±۱/۸۸	۰/۰۰۲
جسم زرد†	۳/۲۶±۱/۱۲	۳/۲۳±۱/۶۴	۴/۰۳±۱/۵۱	۴/۴۵±۱/۳۶	۰/۰۰۱

گروه ۱، ۲، ۳ و ۴ به ترتیب دریافت‌کننده نرمال سالیین، ۷، ۱۰ و ۱۲ واحد هورمون

\* مقدار پیرارائه‌شده با Median ± IQR (کروسیکال والیس و post-hoc Dunn's)

† مقدار پیرارائه‌شده با Mean ± SD (واریانس و آزمون توکی)

در مورد فولیکول چند لایه اختلاف بین گروه (۱ و ۳) p=۰/۰۴، گروه (۱ و ۴) p<۰/۰۰۱، گروه (۲ و ۴) p=۰/۰۰۲

در مورد فولیکول گراف اختلاف بین گروه (۱ و ۳) p=۰/۰۰۳، گروه (۱ و ۴) p<۰/۰۰۴، گروه (۲ و ۴) p=۰/۰۰۶

در مورد جسم زرد اختلاف بین گروه (۱ و ۳) p=۰/۰۰۲، گروه (۱ و ۴) p<۰/۰۰۱، گروه (۲ و ۴) p=۰/۰۰۳

اندازه فولیکول ثانویه یا آنترال در گروه ۳ و ۴ نسبت به گروه ۲، افزایش معنی‌داری داشت. اندازه فولیکول گراف یا بالغ در گروه ۲ نسبت به گروه کنترل، افزایش معنی‌دار و در گروه ۴ نسبت به گروه ۲، کاهش معنی‌داری نشان داد. اندازه جسم زرد در گروه ۳ نسبت به گروه ۲ و نیز نسبت به گروه کنترل، کاهش معنی‌داری داشت (جدول شماره ۲، شکل ۵-۱).

میانگین اندازه تخمدان در گروه ۲ و گروه ۴ نسبت به گروه کنترل افزایش داشت که این اختلاف در مورد گروه ۴ معنی‌دار بود. اندازه تخمدان در گروه ۴ نسبت به گروه ۳، افزایش معنی‌داری نشان داد. اندازه فولیکول اولیه تک‌لایه در گروه‌های ۲، ۳ و ۴ نسبت به گروه کنترل، همچنین در گروه ۳ نسبت به گروه ۲، کاهش معنی‌داری داشت. در بررسی اندازه فولیکول اولیه چندلایه یا پری‌آنترال، اختلاف معنی‌داری بین گروه‌ها مشاهده نشد ( $p < 0.05$ ).

جدول شماره ۲: مقایسه شاخص‌های عددی اندازه متغیرهای مورد بررسی به تفکیک گروه‌های مورد مطالعه					
متغیر (میکرومتر)	گروه ۱	گروه ۲	گروه ۳	گروه ۴	pvalue
فولیکول اولیه تک‌لایه*	159/5±85/9	126/2±43/3	108/6±50/3	130/6±55/4	<0/001
فولیکول اولیه چندلایه*	304/7±100/3	301/8±92/7	322/9±101/6	329/2±103/2	0/2
فولیکول ثانویه*	493/1±245/6	442/0±160/8	651/8±390/6	543/2±339/8	0/003
فولیکول گراف†	1003/2±258/8	1182/7±221	1079/5±218	1039/3±231/9	0/006
تخمدان†	3372/7±683/6	3626/3±748	3303/5±456/3	3908/9±880/3	0/008
جسم زرد†	472/9±104/6	518/1±97/4	417/2±128/8	475/7±92/6	<0/001

گروه ۱، ۲، ۳ و ۴ به ترتیب دریافت‌کننده نرمال سالین، ۷، ۱۰ و ۱۲ واحد هورمون

\* مقادیر ارائه شده با Median ± IQR (کروسیکال والیس و post-hoc Dunn's)

† مقادیر ارائه شده با Mean ± SD (واریانس و آزمون توکی)

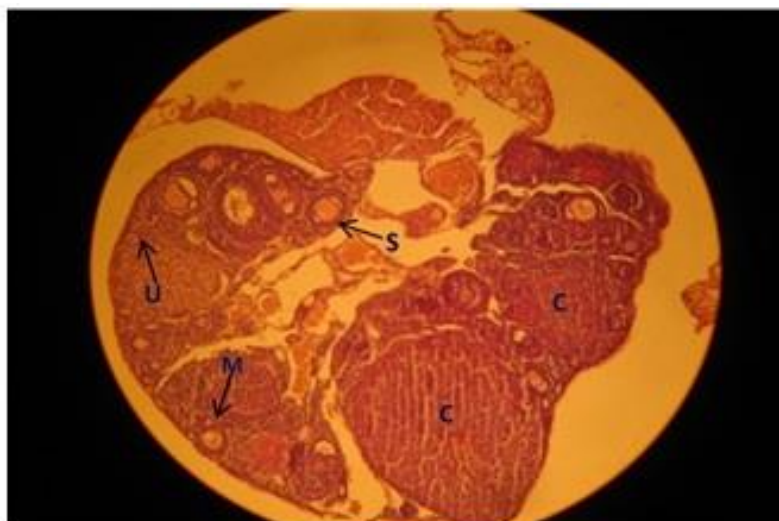
در مورد فولیکول تک‌لایه اختلاف بین گروه (۱ و ۲) و (۱ و ۳) و (۱ و ۴)  $p < 0.001$ ، گروه (۲ و ۳)  $p = 0.001$

در مورد فولیکول ثانویه اختلاف بین گروه (۲ و ۳)  $p < 0.001$ ، گروه (۲ و ۴)  $p = 0.006$

در مورد فولیکول گراف اختلاف بین گروه (۱ و ۲)  $p = 0.006$ ، گروه (۲ و ۴)  $p = 0.001$

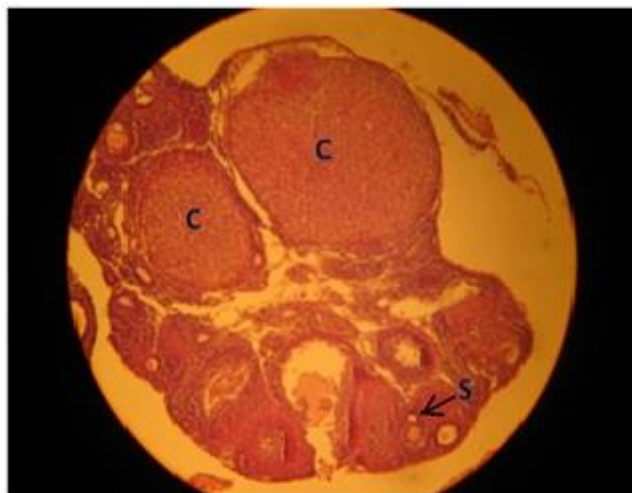
در مورد تخمدان اختلاف بین گروه (۱ و ۴)  $p = 0.001$ ، گروه (۳ و ۴)  $p = 0.001$

در مورد جسم زرد اختلاف بین گروه (۱ و ۳)  $p = 0.001$ ، گروه (۳ و ۴)  $p < 0.001$



شکل شماره ۱: مقطع تخمدان موش از گروه کنترل با بزرگنمایی ۳/۲ و رنگ آمیزی H&E.

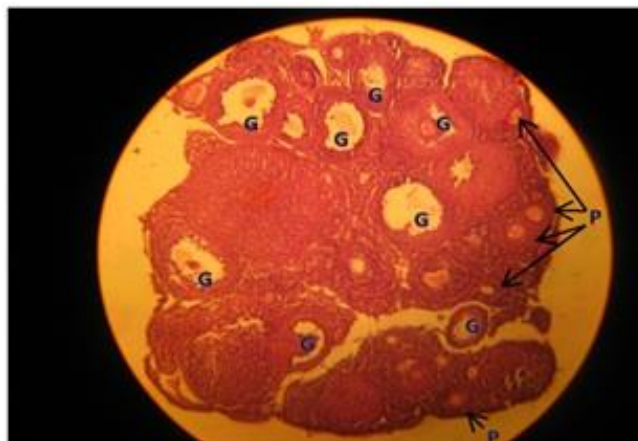
C: جسم زرد، S: فولیکول ثانویه، M: فولیکول اولیه چندلایه و U: فولیکول اولیه تک‌لایه



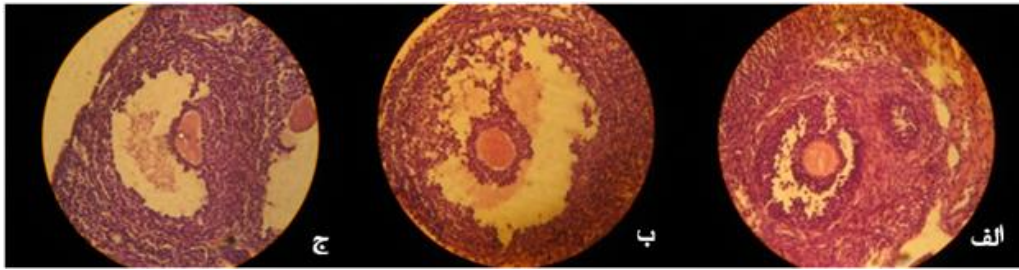
شکل شماره ۲: مقطع تخمدان موش از گروه ۲ با بزرگنمایی ۳/۲ و رنگ آمیزی H&E.  
C: جسم زرد و S: فولیکول ثانویه



شکل شماره ۳: مقطع تخمدان موش از گروه ۳ با بزرگنمایی ۳/۲ و رنگ آمیزی H&E.  
به فراوانی جسم زرد (C) نسبت به گروه کنترل و گروه ۲ و نیز مقطعی از فولیکول ثانویه (S) توجه شود.



شکل شماره ۴: مقطع تخمدان موش از گروه ۴ با بزرگنمایی ۳/۲ و رنگ آمیزی H&E.  
به فراوانی فولیکول گراف (G) نسبت به سایر گروه‌ها و پرآنترال (P) نسبت به گروه ۱ و ۲ توجه شود.



شکل شماره ۵: اندازه فولیکول گراف در گروه دریافت‌کننده دوز ۷ واحد (ب)، نسبت به گروه کنترل (الف) افزایش داشته است. گروه دریافت‌کننده دوز ۱۲ واحد (ج) نسبت به گروه دریافت‌کننده دوز ۷ واحد (ب)، کاهش اندازه داشته است.

## بحث

با توجه به پیشرفت قابل توجه در تکنولوژی کمک باروری در سالهای اخیر، میزان بارداری افزایش چشمگیری را نشان نمی‌دهد، به‌طوری که تعداد زیادی از جنین‌ها در مرحله لانه‌گزینی از دست می‌روند. به‌علاوه، افزایش بروز اختلالات حاملگی از قبیل افزایش فشارخون، خونریزی، جفت سرراهی و وزن پایین هنگام تولد در بارداری‌های حاصل از ART گزارش شده است (۱۹). بررسی تعداد فولیکول‌ها می‌تواند اطلاعات مهمی درباره عملکرد تخمدان، به‌خصوص ارتباط بین فولیکولوژن و فاکتورهای تنظیم آن فراهم کند (۲۰). تحقیقات زیادی در زمینه اثر گنادوتروپین‌ها بر تحریک تخمدان و تعداد فولیکول‌های تخمدانی در جانوران مختلف صورت گرفته و نتایج متعددی به دست آمده است. در بعضی موارد این تفاوت‌ها می‌تواند به علت تغییر برخی عوامل مهم مانند نژاد، سن، فصل، منطقه جغرافیایی، میزان هورمون، زمان تزریق، کیفیت هورمون، وضعیت سلامت و تغذیه حیوان باشد. در زمینه اثر گنادوتروپین‌ها بر اندازه فولیکول‌ها مطالعات محدودی صورت گرفته است، لذا لازم است بررسی‌های بیشتری در این رابطه انجام شود. با توجه به اینکه امروزه در بالین برای درمان زنان با عدم تخمک‌گذاری، از درمان با دوز پایین دارو استفاده شده و در صورت عدم درمان، دوزهای بالاتر دارو به کار می‌رود، لذا در این تحقیق از سه دوز متفاوت دارو استفاده شد تا اثرات آنها مقایسه گردد. از نتایج این تحقیق چنین برمی‌آید که تحریک با PMSG و hCG تعداد فولیکول پری‌آنترال را افزایش می‌دهد، ولی بر تعداد فولیکول آنترال تأثیری ندارد. از طرفی، تحقیقات نشان داده است گنادوتروپین‌ها برای رشد فولیکول آنترال ضروری هستند، اما برای رشد فولیکول‌های پری‌آنترال به آنها نیازی نیست. با این حال مشخص شده است بعد از برداشت

هیپوفیز موش‌ها (۲۱) و میش‌ها (۲۲) گنادوتروپین‌ها بر رشد فولیکول‌ها در مرحله پری‌آنترال تأثیر می‌گذارند. Wang اثر LH و FSH گاوی را بر رشد فولیکول‌های تخمدانی موش‌هایی که هیپوفیز آنها برداشته شده بود مورد بررسی قرار داد و نشان داد FSH تعداد فولیکول‌های آنترال و پری‌آنترال را افزایش می‌دهد، درحالی که LH باعث افزایش فولیکول‌های اولیه و ثانویه می‌شود (۲۳)، که این نتایج با نتیجه تحقیق حاضر مبنی بر افزایش تعداد فولیکول‌های پری‌آنترال مطابقت داشت. همچنین در مطالعه‌ای که Krishna و Singh انجام دادند، اثر تیمار با آگونیست GnRH (Gonadotropin Releasing Hormone) با سه دوز مختلف به مدت ۸ روز بر فولیکولوژن در تخمدان موش مورد بررسی قرار گرفت. در موش‌های تحت تیمار با دوز ۱ μg، تعداد فولیکول‌های آنترال و آرتیک نسبت به گروه کنترل افزایش داشت.

همچنین در تیمار با دوز ۵ μg، کاهش فولیکول آنترال و افزایش فولیکول آرتیک مشاهده گردید، در تیمار با دوز ۲۵ μg نیز تغییرات دژنراتیو اووسیت سلول‌های گرانولوزا فولیکول‌های آنترال و پری‌آنترال دیده شد (۲۴)، که با نتایج حاصله از تحقیق حاضر مغایرت داشت و این امر می‌تواند به علت نوع هورمون، مدت تیمار و دوز تزریقی باشد. در تحقیق حاضر، تغییری در تعداد فولیکول‌های اولیه تک‌لایه مشاهده نشد که این نتیجه با نتایج حاصل از مطالعه بهارآرا و همکاران که نشان دادند هر دو هورمون r-FSH و hMG (human Monoposal Gonadotropin) با دوز ۷/۵ واحد، و نیز hCG با دوز ۵ واحد؛ تأثیری بر روی مراحل اولیه رشد و نمو فولیکول‌های تخمدانی موش Balb/C ندارد، ولی hMG و hCG بر مراحل انتهایی (آنترال اولیه) تکوین فولیکول‌ها اثر داشته و تأثیر بهتری در روند تحریک تخمدان

دارند مطابقت داشت (۲۶،۲۵). تحقیقات Garza نیز نشان داد درمان با LH گاوی پس از برداشتن هیپوفیز در همستر باعث رشد و نمو طبیعی فولیکول‌ها قبل از تخمک‌گذاری می‌شود، درحالی‌که درمان با FSH گاوی فقط تعداد فولیکول‌های کوچک را افزایش می‌دهد (۲۷). همچنین بررسی‌های Allan بر روی موش‌های ماده بالغ که غدد جنسی کوچکی داشتند نشان داد FSH باعث دو برابر شدن تعداد فولیکول‌های اولیه می‌شود (۲۸)، که این نتایج با نتیجه تحقیق حاضر در مورد فولیکول‌های اولیه تک‌لایه مغایرت داشت، ولی با یافته‌های حاصله در مورد فولیکول‌های اولیه چندلایه (پری‌آنترال) همخوانی داشت، که این مغایرت می‌تواند به علت تفاوت کلاس‌بندی فولیکول‌ها باشد. در تحقیق حاضر اندازه تخمدان فقط در گروه ۴؛ یعنی دریافت‌کننده دوز بالا (۱۲ واحد) افزایش نشان داد و دوزهای ۷ و ۱۰ واحدی تأثیری بر اندازه تخمدان نداشتند. در صورتی‌که در مطالعه بهارآرا دوز ۷/۵ واحد rFSH باعث افزایش اندازه تخمدان شد، ولی hMG و hCG با دوز ۷/۵ واحد، تأثیری بر اندازه تخمدان نداشت (۲۶،۲۵). در تحقیق هاشمی‌تبار و همکاران نیز با تحریک موش‌های نژاد NMRI هنگام تخمک‌گذاری با ۷/۵ واحد hMG و سپس ۱۰ واحد hCG در روز پنجم، هیچ تغییری در اندازه تخمدان در گروه‌های تحریک‌شده رخ نداد، ولی در روز سیزدهم، هیپوتروفی تخمدان مشاهده گردید (۲۹). در مطالعه Krishna و Singh که اثر تیمار با آگونیست GnRH با سه دوز مختلف به مدت ۸ روز بر فولیکول‌لوتزن در تخمدان موش مورد بررسی قرار گرفت، مشاهده گردید توده تخمدان در همه گروه‌ها نسبت به گروه کنترل کاهش یافته است (۲۴)، که این تفاوت‌ها می‌تواند به علت نژاد، مدت تیمار، نوع و دوز تزریقی هورمون باشد. در تحقیق حاضر تعداد فولیکول‌های گراف فقط در گروه ۴ نسبت به سایر گروه‌ها افزایش داشت و اندازه فولیکول‌های گراف در گروه ۲ نیز نسبت به گروه کنترل افزایش یافت، ولی در گروه ۴ نسبت به گروه ۲، کاهش اندازه مشاهده گردید. این یافته با نتایج حاصل از تحقیق Worthington که نشان داد در بره‌های ۶ هفته‌ای استفاده از PMGS باعث تحریک تبدیل فولیکول‌ها به جسم زرد و افزایش فولیکول‌های حفره‌دار می‌شود، مطابقت داشت (۳۰).

Ryan و همکاران در بررسی خود گزارش کردند دوز بالای PMSG در مقایسه با دوزهای پایین‌تر اگرچه تعداد فولیکول‌های بالغ را افزایش می‌دهد، اما ممکن است سبب کاهش میزان تخمک‌گذاری شود که این امر می‌تواند به علت تأثیر منفی دوز بالای مورد استفاده باشد (۳۱)، لذا در تحقیق حاضر به همین دلیل می‌توان کاهش اندازه فولیکول گراف در گروه ۴ را توجیه نمود. در تحقیق حاضر اندازه جسم زرد در گروه ۳ نسبت به گروه ۲ و کنترل کاهش یافت. تعداد جسم زرد در گروه‌های ۴ و ۳ نیز نسبت به گروه ۲ و کنترل افزایش نشان داد. در تحقیق هاشمی‌تبار و همکاران نیز با تحریک موش‌های نژاد NMRI هنگام تخمک‌گذاری با ۷/۵ واحد hMG، سپس ۱۰ واحد hCG در زیرگروه دریافت‌کننده hCG، در روز پنجم هیچ تغییری در اندازه جسم زرد در گروه‌های تحریک‌شده دیده نشد، ولی در روز سیزدهم، کاهش اندازه جسم زرد مشاهده گردید (۲۹). همچنین در تحقیق Worthington در بره‌های ۶ هفته‌ای، استفاده از PMSG باعث افزایش تحریک تبدیل فولیکول‌ها به جسم زرد و افزایش فولیکول‌های حفره‌دار شد (۳۰). Kuran و Akifcam نیز گزارش کردند استفاده از دوز ۱۵۰ واحد hCG، دو قلوزایی را افزایش می‌دهد که به نظر می‌رسد این هورمون می‌تواند با تأثیر بر فعالیت فولیکولی تخمدان‌ها و افزایش تعداد جسم زرد سبب افزایش راندمان تولیدمثل شود (۳۲).

همچنین در مطالعه Krishna و Singh، اثر تیمار با آگونیست GnRH در سه دوز مختلف به مدت ۸ روز در تخمدان موش نشان داد در موش‌های تحت تیمار با دوز ۱ μg، تعداد جسم زرد تخمدان نسبت به گروه کنترل افزایش می‌یابد. در تیمار با دوز ۵ μg نیز افزایش تعداد اجسام زرد مشاهده شد که می‌تواند نشانه تخمک‌گذاری اخیر باشد (۲۴)، این یافته‌ها با نتیجه تحقیق حاضر مطابقت داشت. در مطالعه‌ای که بیگی‌بروجنی و همکاران انجام دادند اثر تحریک تخمک‌گذاری با ۱۰ واحد hMG، سپس ۱۰ واحد hCG بر موش‌های نژاد NMRI بر جسم زرد مورد بررسی قرار گرفت. نتایج، کاهش تراکم ارگانل‌های سیتوپلاسمی از جمله میتوکندری و پلی‌ریبوزوم‌ها، کاهش رگ‌زایی و افزایش آپوپتوز و فضای بین‌سلولی در گروه تحریک‌شده هنگام تخمک‌گذاری را نشان داد (۳۳).



## نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان داد تحریک تخمک‌گذاری با هورمون PMSG و hCG باعث کاهش اندازه فولیکول‌های تک‌لایه در هر سه دوز، افزایش تعداد فولیکول‌های اولیه چندلایه و افزایش اندازه فولیکول‌های ثانویه در دوزهای بالاتر می‌شود. همچنین تحریک تخمک‌گذاری با دوز بالا باعث افزایش تعداد و کاهش اندازه فولیکول‌های گراف، افزایش اندازه تخمدان، کاهش اندازه و افزایش تعداد جسم زرد می‌گردد، در صورتی که تحریک با دوز پایین باعث افزایش اندازه فولیکول گراف می‌شود.

## تشکر و قدردانی

بدین وسیله از معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی قزوین جناب آقای دکتر آصف‌زاده، به دلیل همکاری‌های بی‌شائبه ایشان تقدیر و تشکر می‌شود.

همچنین در مطالعات مشخص شده است افزایش فضای بین سلولی می‌تواند منجر به نقص در تکثیر و رشد گردد (۳۴)، که این مطالب دلیل مناسبی برای کاهش اندازه جسم زرد در گروه ۳ می‌باشد. جریان خون نیز نقش مهمی در توسعه جسم زرد و حفظ بارداری دارد (۳۵). بنابراین، می‌توان عنوان کرد تحریک تخمک‌گذاری با hMG و hCG با ایجاد تغییرات فراساختاری و کاهش رگ‌زایی در جسم زرد، در سطح موفقیت و میزان حاملگی تأثیرگذار است (۳۳). برخی مطالعات نشان داده‌اند سطح فیزیولوژیک hCG در دوران بارداری طبیعی به عنوان یک فاکتور رگ‌زایی از طریق سنتز فاکتور رشد اندوتلیال عروقی عمل می‌کند (۳۶). این اختلافات نیز می‌تواند ناشی از دوز بالای hCG در القا نسبت به سطح فیزیولوژیک آن باشد (۳۳).

## References:

1. Leridon H, Slama R. The impact of a decline in fecundity and of pregnancy postponement on final number of children and demand for assisted reproduction technology. Hum Reprod 2008 Jun; 23(6):1312-9.
2. Santos MA, vKuijk EW, Macklon NS. The impact of ovarian stimulation for IVF on the developing embryo. Reproduction 2010 Jan; 139(1):23-34.
3. Brower PT, Schultz RM. Intercellular communication between granulosa cells and mouse oocytes. Existence and possible nutritional role during oocyte growth. Dev Biol 1982 Mar; 90(1):144-53.
4. Hsueh AJ, Billig H, Tsafiriri A. Ovarian follicle atresia: A hormonally controlled apoptotic process. Endocr Rev 1994 Dec; 15(6):707-24.
5. Thomas FH, Walters KA, Tefler EE. How to make a good oocyte: An update on in-vitro models to study follicle regulation. Hum Reprod Update 2003;9(6):541-55.
6. Braw-Tal R, Yossefi S. Studies in vivo and in vitro on the initiation of follicle growth in the bovine ovary. J Reprod Fertil 1997 Jan; 109(1):165-71.
7. McNatty KP, Heath DA, Lundy T, Fidler AE, Quirke L, O'Connell A, et al. Control of early ovarian follicular development. J Reprod Fertil Suppl 1999;54:3-16.
8. Junquera, Luiz Carlos Uchoa. Basic Histology. Amidi F, Translator. Tehran: Khosravi; 2005. p. 544-545. [Text in Persian]
9. Abraham L, Kierszenbaum MD. Histology and cell biology. Toronto: Aharcourt Health Sciences Company SI; 2002. p. 568.
10. Sibug RM, Helmerhorst FM, Tijssen AM, de Kloet ER, de Koning J. Gonadotrophin stimulation reduces VEGF expression in the mouse uterus during the preimplantation period. Hum Reprod 2002 Jun; 17(6):1643-8.



11. Gates AH. Maximizing yield and developmental uniformity of eggs. In: Daniel JC. Methods in mammalian embryology. Sanfrancisco: Freeman Co; 1971. p. 64-75.
12. Liang L, Xu B, Zhu G. Effect of repeated gonadotropin stimulation on ovarian reserves and proliferation of ovarian surface epithelium in mice. *Front Med China* 2009;3(2):220-226.
13. Hogan B, Beddington R, Costantini F, Lacy E. Manipulating the mouse embryo. A laboratory manual. 2<sup>nd</sup> ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1994.
14. Sutton ML, Cetica PD, Beconi MT, Kind KL, Gilchrist RB, Thompson JG. Influence of oocyte-secreted factors and culture duration on the metabolic activity of bovine cumulus cell complexes. *Reproduction* 2003 Jul; 126(1):27-34.
15. Nagyova E, Camaioni A, Prochazka R, Salustri A. Covalent transfer of heavy chains of inter-alpha-trypsin inhibitor family proteins to hyaluronan in vivo and in vitro expanded porcine oocyte-cumulus complexes. *Biol Reprod* 2004 Dec; 71(6):1838-43.
16. Brackett BJ, Zuelke KA. Analysis of factors involved in the in vitro production of bovine embryos. *Theriogenology* 1993 Jan; 39(1):43-64.
17. Barzegari Firouzabadi F, Mirhosaini M. Evaluation of the effect of low-frequency electromagnetic fields on in vitro growth and maturation of mouse oocytes. *J Shahid Sadoughi Univ Med Sci* 2011;20(1):101-109. [Full Text in Persian]
18. Rashidi SH, Eslamian M. Inhibitory effect of follicular development hydrogenated cottonseed oil on mice ovarian. *J Veterinary Faculty Tehran Univ* 2001;56(2):119-122. [Full Text in Persian]
19. Tanbo T, Dale PO, Lunde O, Moe N, Abyholm T. Obstetric outcome in singleton pregnancies after assisted reproduction. *Obstet Gynecol* 1995 Aug; 86(2):188-92.
20. Myers M, Britt KL, Wreford NG, Ebling FJ, Kerr JB. Methods for quantifying follicular numbers within the mouse ovary. *Reproduction* 2004 May; 127(5):569-80.
21. Edwards RG, Fowler RE, Gore-Langton RE, Gosden RG, Jones EC, Readhead C. et al. Normal and abnormal follicle growth in mouse, rat and human ovaries. *J Reprod Fertil* 1977 Sep; 51(1):237-63.
22. Dufour J, Cahill LP, Mauleon P. Short and long term effects of hypophysectomy and unilateral ovariectomy on ovarian follicular populations in sheep. *J Reprod Fertil* 1979 Nov; 57(2):301-9.
23. Wang XN, Greenwald GS. Hypophysectomy of the cyclic mouse, effects of follicle stimulating hormone (FSH) and luteinizing hormone on folliculogenesis, FSH and human chorionic gonadotropinreceptore, and steroidogenesis. *Biol Reprod* 1993 Mar; 48(3):595-605.
24. Singh P, Krishna A. Effects of GnRH agonist treatment on steroidogenesis and folliculogenesis in the ovary of cyclic mice. *J Ovarian Res* 2010 Nov 18;3:26.
25. Baharara J, Moosavifar N, Jalali M, Moghani Lankarani M. Effects of HMG & r-FSH on development of ovarian follicles of female Balb/c mouse. *Feyz. J Kashan Univ Med Sci* 2008;12(1):1-8. [Full Text in Persian]
26. Baharara J, Moosavifar N, Jalali M, Adl F. The effects of human Chorionic Gonadotropin (hCG) on development of ovarian follicles of Balb/c race mouse. *J Birjand Univ Med Sci* 2011;17(4):274-280. [Full Text in Persian]
27. Garza F, Shaban MA, Terranova PF. Luteinizing hormone increase the number of ova shed in the cyclichamster and guinea-pig. *J Endocrinol* 1984 Jun; 101(3):289-98.
28. Allan CM, Wang Y, Jimenez M, Marshan B, Spaliviero J, Illingworth P, et al. Follicle stimulatinghormone increases primordial follicle reserve in mature female hypogonadal mice. *Endocrinology* 2006;188:549-557.
29. Hashemitabar M, Ghavamizadeh B, Javadnia F, Sadain E. The impact of ovarian stimulation and luteal phase support on embryo quality and implantation process in mice. *Iran J Reprod Med* 2004;2(1):15-22.

30. Worthington CA, Kennedy JP. Ovarian response to exogenous hormones in six-week-old lamb. *Aust J Biol Sci* 1979 Feb; 32(1):91-5.
31. Ryan JP, Hunton JR, Maxwell WM. Increased production of sheep embryos following superovulation of Merino ewes with a combination of pregnant mare serum gonadotrophin and follicle stimulating hormone. *Reprod Fertil Dev* 1991;3(5):551-60.
32. Akifcam M, Kuran M. Effects of a single injection of hCG or GnRH agonist on day 12 post mating on fetal growth and reproductive performance of sheep. *Anim Reprod Sci* 2004 Jan; 80(1-2):81-90.
33. Beigi Boroujeni M, Beigi Boroujeni N, Salehnia M, Beigi Boroujeni MA, Marandi E. Ultrastructural changes of corpus luteum after ovarian stimulation at implantation period. *Iran Biomed J* 2012;16(1):33-37.
34. Khan-Dawood FS, Yang J, Dawood MY. Expression of gap junction protein connexin-43 in the human and baboon (*Papio anubis*) corpus luteum. *J Clin Endocrinol Metab* 1996 Feb; 81(2):835-42.
35. Irving-Rodgers HF, Friden BE, Morris SE, Mason HD, Brannstrom M, Sekiguchi K, et al. Extracellular matrix of the human cyclic corpus luteum. *Mol Hum Reprod* 2006 Sep; 12(9):525-34.
36. Michel RM, Aguilar JL, Arrieta O. Human chorionic gonadotropin as an angiogenic factor in breast cancer during pregnancy. *Med Hypotheses* 2007;68(5):1035-40.